



# 高血圧環境におけるレニン遺伝子転写制御機構の解明

著者	牛木 亜季
内容記述	この博士論文は内容の要約のみの公開（または一部非公開）になっています
発行年	2017
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2016
報告番号	12102甲第8151号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/00147874">http://hdl.handle.net/2241/00147874</a>

高血圧環境におけるレニン遺伝子転写制御機構の解明  
(要約版)

2017 年 1 月

牛木 亜季

# 高血圧環境におけるレニン遺伝子転写制御機構の解明

(要約版)

筑波大学大学院  
生命環境科学研究科  
生物機能科学専攻  
博士（農学）学位論文

牛木 亜季

## 第1章

### つくば高血圧マウスにおいて、レニン遺伝子転写は遠位 *cis*-DNA 配列により制御される

#### 導入

レニン-アンジオテンシン系は、血圧恒常性維持に重要なシステムの一つである。レニンは同系の出発反応において、基質アンジオテンシノーゲンと反応し、アンジオテンシン I を産生する。アンジオテンシン I はさらに、アンジオテンシン変換酵素により、最終産物であるアンジオテンシン II へと変換される。アンジオテンシン II は、アンジオテンシン II 受容体に結合することで、血管収縮や、アルドステロン産生を介した体液量の増大により、血圧を上昇させる。レニンによる触媒反応は同系の律速段階であることから、その発現は、血圧恒常性維持のために適切なフィードバック制御を受けている。つまり、高血圧時にはその転写が抑制され、低血圧時には活性化される。レニンは、腎臓輸入細動脈血管壁に存在する傍糸球体細胞 (Juxtaglomerular cells ; JG 細胞) で、主に発現・分泌される。その特異な位置から、同産生細胞は血圧の変動を、血管壁の伸展によるメカニカルストレス、遠位尿細管中のナトリウムイオン負荷によるマクラデンサ・シグナル、あるいは、アンジオテンシン II 受容体を介したフィードバック制御によって感知していると考えられている(1)。しかしながら、レニン遺伝子の血圧応答性制御において、生理的シグナルに関する理解は進んでいるものの、転写因子や、*cis*-DNA 配列といった分子メカニズムについては、ほとんど明らかとなっていない。

これまでに、レニン遺伝子の転写制御に重要な役割を果たす *cis*-DNA 配列

として、mouse distal enhancer (mdE)が報告されている(2,3)。同領域はマウス・レニン遺伝子上流約 3-kb に位置し、レニン産生細胞株 As4.1 において、レニン遺伝子の転写活性を約 80 倍以上に活性化する配列として同定された(2)。しかしながら、その高血圧応答性への関与は明らかとなっていない。また、他の研究グループによる報告から、ヒト・レニン遺伝子においては、同遺伝子タンパク質コード領域の遠位に高血圧環境応答性領域が存在することが示唆されているが(4)、マウス・レニン遺伝子における、同領域の位置は明らかとなっていない。

当研究室では、これまでに、2.8-kb の 5' 制御領域をもつ約 15-kb のヒト・レニンと 14-kb のヒト・アンジオテンシノーゲン導入遺伝子の両方を持つことで、慢性的に高血圧を呈するマウス、「つくば高血圧マウス (THM)」を作製した(5)。THM では、マウス内在遺伝子由来に加え、導入遺伝子由来のアンジオテンシン I が過剰に産生され、アンジオテンシン II に変換されることで高血圧を引き起こす。先に述べたように、レニン遺伝子は、血圧恒常性を維持するように、その転写が制御されている。しかしながら、同マウスは慢性的な高血圧を呈することから、異常な制御を受けている可能性が考えられた。そこで、本研究では、レニン遺伝子の応答性転写制御メカニズム解明の第一歩として、ヒト-マウス間での高血圧環境に対する応答性制御の保存性、ならびに、これに関わる *cis*-DNA 配列の解析を行った。

## 結果

まず、THM におけるヒト・レニン導入遺伝子の発現量を解析し、THM におけるその発現が、正常血圧マウスと比較して著しく上昇していることを確認した。次に、マウス・レニン遺伝子においても、ヒトと同様の制御が存在するのかを解析するために、15-kb ヒト・レニン導入遺伝子と相同な領域を保持するマウス・レニン導入遺伝子（13-kb）を作製し、同導入遺伝子の発現も、THM において上昇することを見出した。そこで、次に、mdE の機能解析を行った。同領域は、13-kb マウス・レニン導入遺伝子の外側に存在し、ヒトにおける相同領域も、15-kb ヒト・レニン導入遺伝子の外側に存在することから、同制御に関わる候補領域になり得ると考えた。しかしながら、156-kb のレニン遺伝子座から mdE を欠失した変異型大腸菌人工染色体（Bacterial artificial chromosome; BAC）導入遺伝子を用いた解析から、mdE は高血圧環境下におけるマウス・レニン遺伝子の転写抑制に必須でないことが明らかとなった。以上のことから、マウス・レニン遺伝子の高血圧環境応答性領域がヒトと同様にタンパク質コード領域の遠位に存在し、種間で保存された応答性メカニズムが存在する可能性が示唆された。

さらに、当研究室では、ヒト・アンジオテンシノーゲン導入遺伝子をもつメスマウスに、ヒト・レニン導入遺伝子をもつオスマウスを交配させることで、妊娠期に胎児胎盤系由来のレニンが母体に流入し、妊娠後期に高血圧を呈する妊娠高血圧マウス（Pregnancy-associated hypertensive mice; PAH mice）を作製している(6)。本研究のこれまでの結果から、成獣期において、15-kb のヒト・レニン導入遺伝子が高血圧に対して、異常な応答を示したことから、PAH マウスにおいても、胎

児が保持するヒト・レニン導入遺伝子が異常に活性化することで、母体の高血圧が引き起こされたのではないかと考えた。そこで、胎児期（17.5dpc）及び、新生児期（生後1日齢）におけるレニン導入遺伝子の発現を解析した。その結果、15-kb ヒト・レニン導入遺伝子の発現は THM の遺伝子型をもつ胎児/新生児において、正常に抑制されていた。また、胎児期における 13-kb マウス・レニン導入遺伝子の発現量は、THM とヒト・レニン導入遺伝子のみをもつマウスとの間で差がなかった。以上の結果から、PAH マウスにおける高血圧は、胎児腎臓におけるヒト・レニン導入遺伝子の応答制御異常によるものではないこと、さらに、THM におけるヒト・レニン導入遺伝子の異常な発現上昇は、生後から成獣期までのどこかの時期から始まることが明らかとなった。

## 考察

これまでに、レニン遺伝子の転写制御研究は、マウス・レニン産生細胞株である As4.1 やヒト・肺がん由来レニン産生細胞株である Calu-6 を用いて精力的に行われ、転写開始点近傍に位置する複数の転写制御領域が同定された(7)。しかしながら、これら領域の *in vivo* での解析結果は、培養細胞での結果と必ずしも一致しない。例えば、基本転写、及び、食塩負荷や脱水などの生理的刺激に対する応答に重要であることが示唆されていた CNRE [overlapping cAMP-responsive (CRE) and negative regulatory elements (NRE)] 配列(8)が、当研究室でのマウス・レニン BAC 導入遺伝子を用いた解析では、これらの刺激応答に対して必須でないことが判明した(9)。また、同 CNRE 配列は、今回作製した 13-kb 導入遺伝子にも含まれていることから、高血圧応答性にも十分でないと考えられる。

mdE は、レニン遺伝子の転写調節において、重要な役割を果たすエンハンサーであるが、同領域の血圧応答性転写制御への関与は完全には分かっていない。他のグループのノックアウトマウス(10)、及び当研究室の BAC 導入遺伝子改変マウスの解析から(11)、同領域はアンジオテンシン変換酵素阻害剤投与におけるレニン遺伝子の転写誘導において、最大レベルの活性化に必要であることが示されている。一方、ヒトにおける同エンハンサーの相同配列である human distal enhancer (hdE) は、血圧降下作用をもつアンジオテンシン変換酵素阻害剤処理による転写誘導、及び高血圧応答性制御に必須でないことが報告されており(12)、血圧応答性制御における、ヒトとマウスでの種間の差が示唆されていた。今回、我々は、mdE 欠失型 BAC 導入遺伝子を用いて、同領域が高血圧応答性に必須でないことを示した。従って、



低血圧応答性制御においては、種間の差が存在するものの、高血圧応答性制御においては、種間の差はないと考えられる。

このように、培養細胞を用いて同定された *cis*-DNA 配列の多くが、個体レベルでの応答性制御に重要な意味を持たない理由として、生理的刺激を培養細胞系で再現することが困難であることが挙げられる。JG 細胞は血管や遠位尿細管と隣接し、これら周囲の細胞から、様々なシグナルを受けとることが予想される。しかしながら、培養細胞系では、これら複合的な要素の影響を調べることができないため、結果的に基本転写活性に必要な領域しか見出せていないことが考えられる。従って、真の応答性領域の同定・検証には、*in vivo* での解析が必須である。

本研究における胎児及び、新生児腎臓の解析結果から、THM の遺伝子型をもつ胎児における 15-kb ヒト・レニン導入遺伝子の発現は、同腹のコントロールのそれと同様に、正常に低下していた。ヒト・アンジオテンシノーゲン導入遺伝子は、少なくとも、胎生 16.5 日から、出生後、成獣にかけて、肝臓や腎臓で十分に発現していることが報告されている(13)。従って、胎児血中でもアンジオテンシン II が産生されていると考えられる。また、羊を用いた解析から、胎児に直接アンジオテンシン II を投与することで、胎児血圧が上昇し、血中レニン活性は低下することが報告されている(14)。従って、THM 胎児における 15-kb のヒト・レニン導入遺伝子発現は、アンジオテンシン II の増加や、それに伴う圧付加に応答して低下していることが予想される。一方で、13-kb マウス・レニン導入遺伝子発現は、コントロールと THM 胎児腎臓との間で有意な違いはみられず、応答性における種間の差があると考えられる。

さらに本研究の結果から、PAH マウスでの高血圧の原因は、胎児腎臓でのレニン転写

制御応答の異常ではなく、Takimoto らの報告で示されているように、妊娠後期の胎盤におけるヒト・レニン遺伝子の発現上昇が主な原因であると考えられる(6)。一方で、この胎盤での発現上昇が、15-kb ヒト・レニン導入遺伝子の遠位制御領域の欠失により起きている可能性は否定できない。ヒトの胎盤を用いた研究では、内在ヒト・レニン遺伝子の発現は妊娠初期に高く、後期では減少することが報告されており(15)、これは PAH マウスでの観察結果と異なる。実際に、Pinet らは、ヒト・レニン遺伝子上流、-5.8~-5.5-kb の位置に、胎盤絨毛膜エンハンサー領域を同定している(16)。ヒト・レニン導入遺伝子がこの領域を欠失していることで、胎盤での発現制御異常が起こっているのかもしれない。

## 第2章 高血圧環境下におけるマウス・レニン遺伝子の転写は、 新規制御領域により抑制される

### 導入

第1章で示したように、我々は複数の遺伝子改変マウスを用いた解析から、高血圧環境応答性制御領域が、13-kb マウス・レニン遺伝子領域の外側、かつ 156-kb 領域の内側にあることを示した。しかしながら、その具体的な位置については未知である。これまでのレニン遺伝子の転写制御研究の多くは、転写開始点の近傍領域に着目しており、遠位領域については、候補となる制御配列すら同定されていない(1)。一方で、過去に 45-kb のヒト・レニン導入遺伝子を用いた興味深い結果が報告されている。同導入遺伝子と 14-kb のヒト・アンジオテンシノーゲン導入遺伝子の両方をもつマウスは、第1章で述べた THM と同様にヒト・レニン-アンジオテンシン系を持つにも関わらず、高血圧を呈さない(17)。この理由として、45-kb のヒト・レニン導入遺伝子のコピー数が少ないため、あるいは、同 45-kb の DNA 断片中に応答性領域が存在することで、高血圧環境に対して適切な応答を示していることが考えられる。そこで、我々は、近年開発された CRISPR/Cas9 ゲノム編集法(18)を用いて、高血圧応答性領域の絞り込みを行った。

## 結果

第1章において、新規の *cis*-制御配列がレニン遺伝子座 13-kb 領域の外側、かつ 156-kb 領域の内側に存在する可能性を示した。そこで、同制御領域の位置をおおまかに決定するために、レニン遺伝子座の上流側及び、下流側を欠失した内在遺伝子座を作製した。遺伝子改変の手法としては、CRISPR/Cas9 ゲノム編集法を用いた。欠失予定領域の両端を標的とする guide RNA、及び Cas9 を発現するプラスミド2種類をマウス受精卵前核に顕微注入し、遺伝子改変マウスを作製した。これらの欠失型遺伝子座を交配によって THM に導入し、その高血圧環境応答性を解析した。その結果、レニン遺伝子上流領域を欠失した遺伝子座では、応答性が消失した。この結果から、レニン遺伝子座の 5' 上流領域に高血圧環境応答性領域が存在することが明らかとなった。

そこで、次に 5' 上流領域の機能をレポーターアッセイにより解析した。5' 上流領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に連結したレポーターコンストラクトを多数構築、マウス・レニン産生細胞株 As4.1 に一過性にトランスフェクションした後、ルシフェラーゼ活性を測定することで機能配列の探索をおこなった。その結果、5' 上流領域中に新規のエンハンサー配列が存在することを見出した。さらに、As4.1 細胞を用いて、DNaseI hypersensitive site mapping を行ったところ、同エンハンサー中に高感受性部位が存在し、転写因子の結合が示唆された。

最後に、As4.1 細胞を用いて同定したエンハンサーの機能を、*in vivo* で検証した。その結果、同エンハンサーは *in vivo* においても、重要な役割を果たすことが明らかとなった。

## 考察

本研究では、THM を用いて、高血圧環境下におけるレニン遺伝子の転写応答を解析したが、具体的にどのような生理的刺激が転写応答に関与しているのかについては、明らかにできていない。高血圧環境下で働く刺激としては、血管壁への圧付加、アンジオテンシン II、マクラデンサ・シグナルなどが存在する(1)。過去の 140-kb ヒト・レニン導入遺伝子を用いた解析から、圧付加を生じない低濃度のアンジオテンシン II 投与でも、ヒト・レニン導入遺伝子及び、内在マウス・レニン遺伝子の発現が抑制されることが報告されており(4)、少なくともアンジオテンシン II 刺激は、レニン遺伝子の転写を抑制すると考えられる。今後、THM を用いた実験系においても、血管拡張剤を用いて血圧を正常に戻した際のレニン遺伝子の転写応答を調べることで、同転写制御における圧負荷刺激の関与の有無を明らかにできると考えている。また、本論文の結果から、分子メカニズムとして、レニン遺伝子 5' 上流領域が応答性制御に重要であることを示したが、同制御に関与する転写因子については、明らかにできていない。アンジオテンシン II シグナルは、Protein kinase C (PKC) を介してレニン遺伝子の転写を抑制することが報告されているため(19)、THM においても、レニン遺伝子の転写抑制に、PKC 経路が関与する可能性が考えられる。分子メカニズムを考える際、応答性制御に関与する *Trans* 因子の同定は、今後の重要な課題である。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導を頂きました筑波大学生命環境系教授 谷本啓司先生に厚く御礼申し上げます。また、あらゆる面において助言を頂きました同教授 深水昭吉先生、同講師 石田純治先生、同助教 松崎仁美先生、医学医療系教授 杉山文博先生、そして、谷本研究室と深水研究室の皆様に心より感謝申し上げます。

なお、本論文第 1 章、及び第 2 章の一部結果は、下記の公表論文の内容に基づいています。

Ushiki A *et al.* (2016)

Long-Range Control of Renin Gene Expression in Tsukuba Hypertensive Mice.

*PLoS One* 11(11): e0166974. doi: 10.1371/journal.pone.0166974.

## 参考文献

1. Bader, M. and Ganten, D. (2000) Regulation of renin: new evidence from cultured cells and genetically modified mice. *J Mol Med (Berl)*, 78, 130-139.
2. Petrovic, N., Black, T.A., Fabian, J.R., Kane, C., Jones, C.A., Loudon, J.A., Abonia, J.P., Sigmund, C.D. and Gross, K.W. (1996) Role of proximal promoter elements in regulation of renin gene transcription. *J Biol Chem*, 271, 22499-22505.
3. Pan, L., Black, T.A., Shi, Q., Jones, C.A., Petrovic, N., Loudon, J., Kane, C., Sigmund, C.D. and Gross, K.W. (2001) Critical roles of a cyclic AMP responsive element and an E-box in regulation of mouse renin gene expression. *J Biol Chem*, 276, 45530-45538.
4. Sinn, P.L., Davis, D.R. and Sigmund, C.D. (1999) Highly regulated cell type-restricted expression of human renin in mice containing 140- or 160-kilobase pair P1 phage artificial chromosome transgenes. *J Biol Chem*, 274, 35785-35793.
5. Fukamizu, A., Sugimura, K., Takimoto, E., Sugiyama, F., Seo, M.S., Takahashi, S., Hatae, T., Kajiware, N., Yagami, K. and Murakami, K. (1993) Chimeric renin-angiotensin system demonstrates sustained increase in blood pressure of transgenic mice carrying both human renin and human angiotensinogen genes. *J Biol Chem*, 268, 11617-11621.
6. Takimoto, E., Ishida, J., Sugiyama, F., Horiguchi, H., Murakami, K. and Fukamizu, A. (1996) Hypertension induced in pregnant mice by placental renin and maternal angiotensinogen. *Science*, 274, 995-998.
7. Pan, L. and Gross, K.W. (2005) Transcriptional regulation of renin: an update. *Hypertension*, 45, 3-8.
8. Tamura, K., Chen, Y.E., Horiuchi, M., Chen, Q., Daviet, L., Yang, Z., Lopez-Illasaca, M., Mu, H., Pratt, R.E. and Dzau, V.J. (2000) LXRalpha functions as a cAMP-responsive transcriptional regulator of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 8513-8518.
9. Tanimoto, K., Sugiura, A., Kanafusa, S., Saito, T., Masui, N., Yanai, K. and Fukamizu, A. (2008) A single nucleotide mutation in the mouse renin promoter disrupts blood pressure regulation. *J Clin Invest*, 118, 1006-1016.
10. Markus, M.A., Goy, C., Adams, D.J., Lovicu, F.J. and Morris, B.J. (2007) Renin

enhancer is crucial for full response in Renin expression to an in vivo stimulus. *Hypertension*, 50, 933-938.

11. Tanimoto, K., Kanafusa, S., Ushiki, A., Matsuzaki, H., Ishida, J., Sugiyama, F. and Fukamizu, A. (2014) A mouse renin distal enhancer is essential for blood pressure homeostasis in BAC-rescued renin-null mutant mice. *J Recept Signal Transduct Res*, 34, 401-409.
12. Zhou, X., Davis, D.R. and Sigmund, C.D. (2006) The human renin kidney enhancer is required to maintain base-line renin expression but is dispensable for tissue-specific, cell-specific, and regulated expression. *J Biol Chem*, 281, 35296-35304.
13. Yang, G. and Sigmund, C.D. (1998) Developmental expression of human angiotensinogen in transgenic mice. *Am J Physiol*, 274, F932-939.
14. Siegel, S.R., Oaks, G. and Palmer, S. (1981) Effects of angiotensin II on blood pressure, plasma renin activity, and aldosterone in the fetal lamb. *Dev Pharmacol Ther*, 3, 144-149.
15. Pringle, K.G., Tadros, M.A., Callister, R.J. and Lumbers, E.R. (2011) The expression and localization of the human placental prorenin/renin-angiotensin system throughout pregnancy: roles in trophoblast invasion and angiogenesis? *Placenta*, 32, 956-962.
16. Germain, S., Bonnet, F., Philippe, J., Fuchs, S., Corvol, P. and Pinet, F. (1998) A novel distal enhancer confers chorionic expression on the human renin gene. *J Biol Chem*, 273, 25292-25300.
17. Catanzaro, D.F., Chen, R., Yan, Y., Hu, L., Sealey, J.E. and Laragh, J.H. (1999) Appropriate regulation of renin and blood pressure in 45-kb human renin/human angiotensinogen transgenic mice. *Hypertension*, 33, 318-322.
18. Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A. et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339, 819-823.
19. Muller, M.W., Todorov, V., Kramer, B.K. and Kurtz, A. (2002) Angiotensin II inhibits renin gene transcription via the protein kinase C pathway. *Pflugers Arch*, 444, 499-505.